

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 1/15, C12P 17/18, C12N 15/80, 15/67 // (C12N 1/15, C12R 1:645) (C12P 17/18, C12R 1:645)	A1	(11) 国際公開番号 WO97/00944 (43) 国際公開日 1997年1月9日 (09.01.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/01692 (22) 国際出願日 1996年6月19日 (19.06.96) (30) 優先権データ 特願平7/155973 1995年6月22日 (22.06.95) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 明治製菓株式会社 (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD) [JP/JP] 〒104 東京都中央区京橋2-4-16 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 青柳 薫 (AOYAGI, Kaoru) [JP/JP] 渡辺 学 (WATANABE, Manabu) [JP/JP] 村上 健 (MURAKAMI, Takeshi) [JP/JP] 〒250 神奈川県小田原市栢山788. 明治製菓株式会社 薬品技術研究所内 Kanagawa, (JP) 矢内耕二 (YANAI, Kohji) [JP/JP] 〒350-02 埼玉県坂戸市千代田5丁目3番1号 明治製菓株式会社 生物科学研究所内 Saitama, (JP)		(74) 代理人 弁理士 古谷 馨, 外 (FURUYA, Kaoru et al.) 〒103 東京都中央区日本橋堀留町1-8-11 日本橋TMビル Tokyo, (JP) (81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: TRANSFORMANT PRODUCING SUBSTANCE PF1022 AND METHOD FOR TRANSFORMING MICROORGANISM BELONGING TO THE CLASS HYPHOMYCETES (54) 発明の名称 PF1022物質を産生する形質転換体、及び糸状菌綱に属する菌の形質転換方法 (57) Abstract A method for transforming PF1022 strain, which produces a cyclic depsipeptide (substance PF1022) and belongs to Agonomycetales of the class Hyphomycetes, by using a plasmid consisting of a promoter, a terminator, a marker gene and a target gene. When the strain PF1022 is transformed by this method, the gene encoding the enzyme, i.e., the target gene is transduced into the host. As a result, the utilization of nutrients by the strain is improved and, further, its cyclic depsipeptide productivity is improved.		

BEST AVAILABLE COPY

(57) 要約

プロモーター、ターミネーター、マーカー遺伝子及び目的遺伝子から構成されたプラスミドを用いて、環状デブシペプチド（PF1022物質）を産生する、糸状菌綱無孢子不完全菌目に属するPF1022株を形質転換する方法を確立した。この方法により、PF1022株を形質転換したところ、宿主に、目的遺伝子である酵素をコードする遺伝子が導入された。その結果、PF1022株の栄養利用が改善されると共に、環状デブシペプチドの生産性も改良された。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LS	レソト	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BE	ベルギー	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロバキア
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MD	モルドバ共和国	SN	セネガル
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	IE	アイルランド	MK	マケドニア共和国	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IL	イスラエル	ML	マリ	TG	トーゴ
CA	カナダ	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CC	ココス（パーム）	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	JP	日本	MW	マラウイ	TR	トルコ
CH	スイス	KE	ケニア	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボワール	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CN	中国	KR	大韓民国	NL	オランダ	US	アメリカ合衆国
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
CZ	チェコ共和国			NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム

明細書

PF1022物質を産生する形質転換体、
及び糸状菌綱に属する菌の形質転換方法

発明の背景発明の分野

本発明は、環状デプシペプチドであるPF1022物質を産生する形質転換体、PF1022物質の生産方法、PF1022物質の生産性を向上させる方法、及び糸状菌綱に属する菌の形質転換方法に関する。

関連技術の記述

糸状菌綱に属する菌は、抗生物質、生理活性物質及び酵素等の多岐にわたる有用物質を、その代謝産物として産生する。従って、古くより、当該菌を大量に培養し、その産生物質を得るための方法が、検討され、開発されてきている。菌の産生物質を効率的に得るための一般的な手法の一例として、UV照射や変異誘導剤の使用等により、人工的に突然変異株を作出し、得られた突然変異株の中から、目的とする物質を多量に生産する株を選抜することからなる手法があげられる。

このような方法で新たに作出された菌株（以下、高生産性株ということがある）は、必ずしも、その親株と同一の培地や培養条件で、目的とする代謝産物を高い生産性で産生するとは限らない。従って、上記の手法で高生産性株を得ても、菌株毎に、それに見合った培地及び培養条件を検討することが必要とされている。特に、大型の発酵槽を用いる場合には、上述のように品種改良された高生産株を用いても、その培地及び培養条件によって、その発酵生産物の産生量に大きな差が生じる。そこで、目的とする代謝産物を効率よく得るには、高生産性株を培養するための培地組成、培地殺菌条件、通気攪拌量、培地および培養中のpH及び温度等を詳細に検討し、培養に関わる各種パラメーターを測定、分析し、その結果を踏まえてその発酵代謝を制御する必要がある。

発酵条件等の安定化や経済的な目的物質の入手のために、菌の培養の為に培地原料を限定することがある。しかし、当該培地原料を、菌に栄養として効率的に

利用させるためには、その培地原料を、菌がその栄養として利用し得る物質に変えるための新規遺伝形質を、当該菌に付与する必要がある場合がある。そのような場合には、そのような新規遺伝形質の付与は、上記したような、通常の変異処理では困難である。このような理由から、遺伝子工学的な手法を用いて、特定の菌に特定の外来遺伝子を導入し、当該菌に新規遺伝形質を付与することからなる分子育種が期待されている。しかし、糸状菌綱に属する菌類に関しては、細菌や酵母等とは異なり、当該菌の形質転換に適した自立複製型のプラスミドが殆ど知られていないこと、多くが多核細胞であること、プロトプラスト形成及び再生頻度が著しく低いこと等により、形質転換が困難な場合が多い。実際、遺伝子工学的な手法による糸状菌綱に属する菌の形質転換は、一部の糸状菌、例えば、*A. nidulans* (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 1470(1984)参照)、*A. oryzae* (Agric. Biol. Chem., 51, 323(1987)参照)、*A. niger* (Curr. Genetics, 11, 499(1987)参照)を用いて行われているに過ぎない。

ところで、糸状菌綱中の無孢子不完全菌目に属するある種の菌は、例えば特開平3-35796号公報(1991年2月15日発行)に記載されているように、駆虫活性を有する環状デプシペプチド(即ち、PF1022物質)等の有用物質を産生することが知られている。従って、糸状菌綱に属する菌の形質転換方法を確立すれば、上記のPF1022物質を産生する菌に、PF1022物質の産生に有利な新規遺伝形質を、遺伝子工学的な手法で付与することが出来る。具体的には、PF1022物質を産生する菌に、PF1022物質の生産性を向上させ得る、その生合成に関与する物質をコードする遺伝子や、その培地原料の変更を可能とする、アミラーゼ、リパーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼ等の酵素をコードする遺伝子を導入し、その遺伝子によってコードされる新規遺伝形質を発現させることが出来る。得られた形質転換体を培養すれば、PF1022物質や導入された外来遺伝子によってコードされる物質(例えば、蛋白質やペプチド)が、多量に産生され得る。しかしながら、PF1022物質を産生する菌の形質転換方法は、上記した糸状菌綱に属する菌が一般的に有するその形質転換の困難さに加え、その薬剤耐性度、形質転換体の選択のためのマーカー遺伝子及び外来遺伝子を稼働させるためのプロモーターが不明なこと等に起因して、これまでには開発

されていない。

発明の開示

発明の概要

本発明者らは、P F 1 0 2 2 物質を産生する菌（以下、単に、P F 1 0 2 2 物質産生菌ということがある）の一つである、糸状菌綱無孢子不完全菌目に属する P F 1 0 2 2 株の形質転換方法について、鋭意検討した。その検討の結果、本発明者らは、プロモーター、ターミネーター、マーカー遺伝子及び目的遺伝子から構成されたプラスミドにより、前記菌が形質転換され得ることを見出した。更に、本発明者らは、*Aspergillus nidulans*由来の菌が有する *trpC* 遺伝子のプロモーター及びターミネーターと、マーカー遺伝子としての、*Escherichia coli* 由来の菌が有するハイグロマイシン B 耐性遺伝子で構成される耐性遺伝子発現カセットに、目的遺伝子を連結して調製されたプラスミドを用いて、P F 1 0 2 2 株を形質転換することに成功した。当該方法により得られた形質転換体を培養したところ、導入した目的遺伝子に由来する蛋白質（酵素）の大量発現が確認されると共に、P F 1 0 2 2 物質の生産性の向上も確認された。本発明は、このような知見を基に完成された。

即ち、本発明は、P F 1 0 2 2 物質を産生する宿主を、プロモーター、ターミネーター、マーカー遺伝子及び目的遺伝子から構成されたプラスミドを用いて形質転換してなる、P F 1 0 2 2 物質を産生する形質転換体に関する。

また、本発明は、前記の形質転換体を培養する工程と、得られた培養物から生成物を取り出す工程からなる、P F 1 0 2 2 物質の生産方法に関する。

更に、本発明は、P F 1 0 2 2 物質を産生する宿主を、プロモーター、ターミネーター、マーカー遺伝子及び、P F 1 0 2 2 物質の生合成に関与する物質をコードする遺伝子及び／又は宿主の栄養利用に関連する物質をコードする遺伝子から構成されたプラスミドを用いて形質転換することからなる、P F 1 0 2 2 物質産生菌の P F 1 0 2 2 物質の生産性を向上させる方法に関する。

加えて、本発明は、糸状菌綱無孢子不完全菌目に属する P F 1 0 2 2 株を、プロモーター、ターミネーター、マーカー遺伝子及び目的遺伝子から構成されたプ

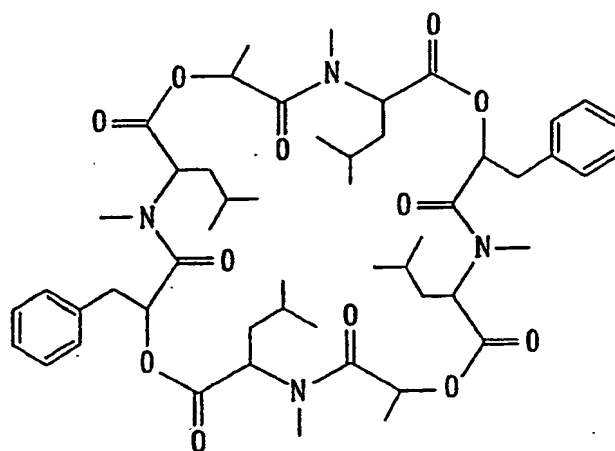
ラスミドを用いて形質転換することからなる、形質転換方法に関する。

以下に、本発明を詳細に説明する。

発明の詳細な説明

本発明の形質転換体は、PF1022物質を産生する宿主を、特定のプラスミドを用いて形質転換してなるものである。ここで、PF1022物質とは、環状デブシペプチドの一種であり、その性状は、特開平3-35796号公報（1991年2月15日発行）に詳述されているが、その概要を述べると以下の通りである：

- (1) 色及び形状： 無色結晶、
- (2) 融点： 104～106℃
- (3) 分子式： $C_{42}H_{78}N_4O_{12}$
- (4) マススペクトル (EI-MS)： m/z 948 (M^+)、
- (5) 比旋光度： $[\alpha]_D^{22} -102^\circ$ (c 0.1、メタノール)
- (6) 溶解性： メタノール、酢酸エテル、アセトン、クロロホルム及びジメチルスルホキシドに溶解し、水には不溶、
- (7) 塩基性、酸性、中性の区別： 中性物質、及び
- (8) 化学構造式： 下記式(1)で示される；



(1).

本発明の形質転換体を調製するために用いられる宿主は、PF1022物質を産生する菌（以下、PF1022物質産生菌ということがある）であれば、いずれでもよい。PF1022物質産生菌の例として、糸状菌綱無孢子不完全菌目に属するPF1022株〔工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1-1-3、〒305）に、1989年1月24日に寄託され、現在、FERM BP-2671の受託番号が付されている〕が挙げられる。PF1022株は、駆虫活性を有する前記PF1022物質を産生する菌であり、その性状は、特開平3-35796号公報（1991年2月15日発行）に詳述されているが、その菌学的性状の概要を述べると以下の通りである：

（1）生育： ポテト・デキストロース寒天培地、ポテト・キャロット寒天培地、麦芽エキス寒天培地及びオートミール寒天培地上で、25℃にて良く生育するが、ツアベック・ドックス寒天培地、三浦寒天培地及びコーンミール寒天培地上では、25℃での生育は悪い。また、37℃では生育しない。

（2）形態： 白色綿毛状菌糸を形成する。集落の裏面は、最初は白色乃至淡黄色であり、後に黒褐色の斑点を生じる。分生子などの特徴的形態は観察されない。

PF1022株は、他のカビに見られるように、その性状が変化しやすい。そのような、この菌株に由来する突然変異体、形質接合体あるいは遺伝子組換体であっても、PF1022物質を産生する限り、宿主として使用できることは、言うまでもない。

本発明で用いられる形質転換用プラスミドは、大腸菌で複製可能なクローニングベクター（pUCベクター、pTVベクター、pBluescript、pBR 322等）をその基体とし、それに加えて、宿主で機能するプロモーター、N末端より始まるマーカ遺伝子、目的遺伝子、及び宿主で機能するターミネーターで構成される。

本発明に用いるプロモーター及びターミネーターは、宿主に応じて選択されるが、宿主内でその機能を発揮するものである限り、特に限定されない。例えば、PF1022株を宿主として用いる場合には、プラスミドの構成要素としてのプロモーター及びターミネーターは、糸状菌綱に属する菌に由来のものを用いる。その例として、糸状菌綱に属する菌に由来する、3-ホスホグリセレートキナーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、エノラーゼ等

の解糖系酵素遺伝子、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ、トリプトファンシンターゼ等のアミノ酸合成系酵素遺伝子、アミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、アセトアミダーゼ等の加水分解酵素遺伝子、ナイトレートルダクターゼ、オロチジン-5'-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ等の酸化還元酵素遺伝子の、プロモーター領域及びターミネーター領域があげられる。

本発明に用いるマーカー遺伝子は、形質転換がなされた菌株を選択するためのマーカーとして使用できる、ある種の形質をコードする遺伝子であれば、特に限定されない。その例として、薬剤耐性遺伝子及び栄養要求性に関わる遺伝子が挙げられる。即ち、宿主として用いられた菌が感受性を有する、ある種の薬剤に対する耐性遺伝子、及び、宿主がある種の栄養要求性菌である場合に、その菌にその栄養を要求しない形質を付与する遺伝子が、マーカー遺伝子として用いられる。

薬剤耐性遺伝子の例として、*E. coli* 由来の菌が有するハイグロマイシンB耐性遺伝子、*Streptomyces rimofaciens*由来の菌が有するデストマイシン耐性遺伝子、及び*Streptococcus hindustanus* 由来の菌が有するフレオマイシン耐性遺伝子が挙げられる。また、栄養要求性に関わる遺伝子の例として、それぞれがアルギニン及びトリプトファン要求性に関わる、*ArgB* (John, M.A. and Peberdy, J.F., *Enzyme Microbiol. Technol.* 6, 386-389(1984)参照) 及び *trpC* (Yelton, M.M., Hamer, J. E. and Timberlake, W. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 1470-1474(1984) 参照) が挙げられる。

薬剤耐性遺伝子発現カセット、例えば、*A. nidulans* 由来の菌が有する *trpC* 遺伝子のプロモーター領域とターミネーター領域とを用い、*E. coli* 由来の菌が有するハイグロマイシンB耐性遺伝子を糸状菌綱に属する菌で発現可能にした *hyg^rXbaI* (D. Cullen et al., *Gene*, 57, 21-26(1987) 参照)、が知られており、本発明に係るプラスミドの調製に際し、このようなカセットを用いることもできる。このように構成された薬剤耐性遺伝子発現カセットを、他のプラスミド（例えば所望の酵素をコードする遺伝子を有するもの）に所定位置で結合させ、そのように調製されたプラスミドを用いて宿主を形質転換すると、所望の形質（例えば酵素）を発現する菌株を選択するために、当該カセット中の薬剤耐性遺伝子に

由来する形質であるその薬剤耐性を、利用することができる。

本発明に用いる目的遺伝子は、特に限定されないが、その例として、形質転換体の培養における栄養利用に関与する、換言すれば、培地原料の変更を可能にする、物質を発現する遺伝子、具体的には、アミラーゼ、リパーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼ等の酵素蛋白質をコードする遺伝子、宿主が生合成する有用物質、即ち本発明ではPF1022物質、の生産性向上に寄与し得るその生合成に関連する物質をコードする遺伝子、及び、宿主が生合成する有用物質と同種又は異種の有用蛋白質、例えばペクチナーゼ、キチナーゼやペプチド、をコードする遺伝子が挙げられる。これらの遺伝子は、生物由来であっても、化学合成したものであってもよい。

本発明に係る、プロモーター、ターミネーター、マーカー遺伝子及び目的遺伝子から構成されたプラスミドとして、例えば、前記した薬剤耐性遺伝子発現カセットであるhyg^rXbaIに、目的遺伝子としての*A. niger*由来の α -アミラーゼ遺伝子を連結させてなるpAMY-Hygを用いることができる。そのようなプラスミドである、*Escherichia coli* JM109/pAMY-Hygは、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1-1-3、〒305）に、1996年6月14日に寄託され、FERM BP-5569の受託番号が付されている。

本発明では、宿主の形質転換に際し、菌のプロトプラスト化、ポリエチレングリコール処理及び再生培地での培養の工程を含む方法を適用することが好ましい。具体的には、等張シュークロース溶液中で、菌体を、プロトプラスト化酵素溶液で処理し、プロトプラストを調製する。このプロトプラストに、本発明に係るプラスミドとポリエチレングリコールとを接触させ、当該プラスミドをプロトプラストに取り込ませる。得られたプロトプラストを、選択薬剤存在下あるいは宿主が要求する特定の栄養成分不存在下で、再生培地にて培養する。このようにして、マーカー遺伝子によって発現された形質、例えば薬剤耐性や栄養非要求性、を示す形質転換体を得られる。

特定の宿主を、プロモーター、ターミネーター、マーカー遺伝子及び目的遺伝子から構成されたプラスミドを用いて形質転換することによって調製された形質転換体は、その宿主が産生する物質と、遺伝子工学的手法で導入された目的遺伝

子がコードする物質、例えば蛋白質やペプチド、を産生する。従って、適切な条件下に形質転換体を培養すれば、その宿主が産生する物質を高効率で得ることや、導入された目的遺伝子がコードする物質を得ることが可能である。

具体的には、本発明の形質転換体は、慣用の成分、例えば炭素源、窒素源、無機塩、増殖因子成分、を含む液体培地中で、好氣的条件での培養法、振盪培養法、通気攪拌培養法及び深部培養法等の公知の培養法により、培養することができる。培地のpHは、例えば7～8程度である。培養条件は、宿主の培養に採用される通常の条件でよい。例えば宿主が糸状菌綱に属するPF1022株である場合、温度は15～45℃、好ましくは15～30℃、培養時間は24～240時間程度で、形質転換体の培養を行うことができる。

本発明の形質転換体を培養することによって得られる、当該形質転換体が産生する物質、具体的には、PF1022物質やその他の蛋白質やペプチド、の培養物からの回収にあたっては、その産生物質の性状を考慮した通常の分離手段、例えば溶剤抽出法、イオン交換樹脂法、吸着カラムクロマト法、分配カラムクロマト法、ゲル濾過法、透析法及び沈澱法、を単独で又は適宜組み合わせる用いることができる。

本発明の形質転換方法によれば、アミラーゼ、リパーゼ、プロテアーゼ及びセルラーゼ等の、菌の栄養利用（換言すれば、培地原料の選択）に影響を与える物質をコードする遺伝子や、菌によるPF1022物質の生合成に関与する物質をコードする遺伝子を、宿主（PF1022物質産生菌）に導入する事ができる。その結果、導入された遺伝子がコードする物質の大量生産や、PF1022物質の経済的且つ効率的な生産可能となる。

図面の簡単な説明

図1は、pAMY-Hygの構築方法を示すフローシートである。

図2は、形質転換体の培養上澄クロマト分画の、アミラーゼ活性測定結果を示すグラフである。

図3は、親株（宿主）の培養上澄クロマト分画の、アミラーゼ活性測定結果を示すグラフである。

実施例

以下に、実施例であって、発明がそれに限定されるときではないものを参照して、本発明を詳細に説明する。

実施例 1 プラスミド pDH25 (D. Cullen et al., Gene, 57, 21-26 (1987) 参照)

による P F 1 0 2 2 株の形質転換

P F 1 0 2 2 株の種培地として、可溶性澱粉 2.0%、グルコース 1.0%、ポリペプトン 0.5%、小麦胚芽 0.6%、酵母エキス 0.3%、大豆粕 0.2% 及び炭酸カルシウム 0.2% からなり、殺菌前 pH が 7.0 であるものを使用した。

P F 1 0 2 2 株を、前記種培地で、26℃にて48時間培養した。その後、3,000 rpm、10 分間の遠心分離により、菌糸体を集菌し、0.5M シュークロース溶液で洗浄した。得られた菌糸体を、 β -グルクロニダーゼ (シグマ社製) 3mg/ml、キチナーゼ (シグマ社製) 1mg/ml 及びザイモラーゼ (生化学工業社製) 1mg/ml を含む 0.5M シュークロース溶液中で、30℃にて2時間振盪することにより、プロトプラスト化させた。得られた混合物を濾過し、菌体残渣を除去した。SUTC 緩衝液 (0.5M シュークロース、10mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、10mM 塩化カルシウム) で 2 回遠心分離 (2,500rpm、10分間、4℃) することにより、プロトプラストを洗浄し、次いで、SUTC 緩衝液で 10^7 個/ml のプロトプラスト懸濁液を調製した。

プロトプラスト懸濁液に、当該懸濁液 100 μ l あたり 10 μ l の、1 mg/ml 濃度のプラスミド pDH25 溶液 (TE、10mM トリス-塩酸 (pH 8.0)、1mM EDTA) を加え、得られた混合物を氷冷下に 5 分間放置した。その後、当該混合物に、ポリエチレングリコール (PEG 6000) 溶液 400 μ l を加え、得られた混合物を、氷冷下に更に 20 分間放置した。

SUTC 緩衝液で PEG 6000 を洗浄した後、以上のように処理したプロトプラストを、SUTC 緩衝液に再度懸濁した。得られた懸濁液を、100 μ g/ml のハイグロマイシン B を含むポテトデキストロース寒天培地 (以下、PDA 培地と略す) に、ポテトデキストロース軟寒天培地と共に重層した。26℃にて5日間培養し、コロニーを生育させた。このようにして、形質転換体のコロニーを得た。

実施例 2 プラスミド pDH25 による形質転換体の、ハイグロマイシン B 耐性の確認

実施例 1 では、300 株の形質転換体を得られた。形質転換効率は、30 個の形質転換体 / $1 \mu\text{g}$ のプラスミド pDH25 であった。親株 (PF-1022 株) と、これら形質転換体のうちの 10 株を、前述の PDA 培地で培養し、それらのハイグロマイシン B に対する耐性を確認したところ、親株は、ハイグロマイシン B が $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の培地で生育不能であったのに対し、試験に供された全ての形質転換体は、 $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でハイグロマイシン B に対する耐性を示した。

実施例 3 プラスミド pAMY-Hyg の構築

公知の方法によって得られた、*A. oryzae* 由来の菌が有するタカアミラーゼ遺伝子 (S. Wisel et al., Mol. Microbiol., 3, 3-14 (1989)、M. J. Gines et al., Gene, 79, 107-117 (1989)、S. Tada et al., Agric. Biol. Chem., 53, 593-599 (1989)、及び Tsukagoshi et al., Gene, 84, 319-327 (1989) 参照) をプローブとして用い、公知の方法により、*A. niger* の α -アミラーゼ遺伝子を含む 5.5 kbp の Eco RI 断片 (以下、amyB という) を単離した。この断片を、公知の方法により、pUC118 の Eco RI 部位に連結し、プラスミド pAMY を調製した。

一方、プラスミド pDH25 を Eco RI で部分消化し、得られた断片に Xba I リンカーを連結させた。その後、得られた遺伝子を更に Xba I で消化した。このようにして、*A. nidulans* 由来の菌が有する trpC 遺伝子のプロモーター領域及びターミネーター領域と、*E. coli* 由来の菌が有するハイグロマイシン B 耐性遺伝子で構成されるハイグロマイシン耐性遺伝子発現カセット (以下、hyg^rXbaI カセットという) を、3 kbp の Xba I 断片として調製した。この断片を、公知の方法により、プラスミド pAMY の Xba I 部位に挿入し、プラスミド pAMY-Hyg (FERM BP-5569) を構築した (図 1 参照)。

実施例 4 プラスミド pAMY-Hyg による形質転換によって得られた形質転換体のハイグロマイシン B 耐性と、そのアミラーゼ活性及び PF 1022 物質の生産性

実施例 1 に記載の方法に従い、プラスミド pAMY-Hyg を用いて PF 1022 株 (FERM BP-2671) を形質転換した。得られた形質転換体のうち、10 株について、

実施例 1 に記載の方法に従い、そのハイグロマイシン B 耐性を確認したところ、いずれもが、 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度のハイグロマイシン B 存在下でも生育可能であった。

次に、生産培地として、グルコース 2.0%、澱粉 5.0%、小麦胚芽 0.8%、大豆粕 1.3%、肉エキス 0.38%、塩化ナトリウム 0.13% 及び炭酸カルシウム 0.15% からなり、殺菌前 pH が 7.0 であるものを調製した。この生産培地を使用し、前記形質転換体を、 26°C で 6 日間培養した。

培養上澄のアミラーゼ活性を、アミラーゼテストワコー（和光純薬社製）のプロトコル、即ち、ヨードデンプン法、に従って測定した。具体的には、基質緩衝液として、 0.25M リン酸緩衝液（pH 7.0、 $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ の可溶性澱粉含有）を、発色試液として、 0.01N 沃素液を、それぞれ用いた。 37°C にて、基質緩衝液に検体（培養上澄）を加えた。所定時間経過後、得られた混合物に発色試液と蒸留水を加え、得られた混合物を比色定量した。比色定量には、分光光度計 Hitachi u-2000（（株）日立製作所製）を用いた。得られた測定結果から、caraway 法にて、培養上澄のアミラーゼ活性を算出した。

その測定の結果、親株（PF-1022 株）は、アミラーゼ活性が 16 単位/ ml であったのに対し、形質転換体は、その約 100 倍のアミラーゼ活性を示した。特に、TF10 株は、 $34,171$ 単位/ ml 、即ち親株の約 1,500 倍、のアミラーゼ活性を示した。また、形質転換体の PF-1022 物質の生産性は、親株のその約 120~150% であり、親株に比べてその生産性が向上したことが確認された（表 1 参照）。

表 1

株	ハイグロマイシンB耐性 (2000 μ g/ml)	アミラーゼ活性 (Unit)	PF1022物質生産量 (μ g/ml)
TF1	+	1765	1427
TF2	+	906	
TF3	+	1445	1423
TF4	+	2596	
TF5	+	2131	1414
TF6	+	1647	
TF7	+	30	1227
TF8	+	22	
TF9	+	797	1301
TF10	+	34171	1515
親	-	16	1042

形質転換体TF6株、TF7株及びTF10株と、親株のPF1022株より、Horiuchiらの方法(H. Horiuchi et al., J. Bacteriol., 170, 272-278(1988)参照)に従って、染色体DNAを単離した。当該DNAを、制限酵素Bam HI又はEco RIで消化し、得られたDNA断片を、pAMY-Hygをプローブとして用いてサザンハイブリダイゼーション解析に供した。サザンハイブリダイゼーションは、ECLダイレクト核酸標識&検出システムのキット(Amersham社製)に記載のプロトコルに従った。具体的には、次の条件下に、サザンハイブリダイゼーションを行った。

DNA変性用溶液として、0.25N 塩酸と、0.5M水酸化ナトリウム水溶液とを用いた。トランスファー・メンブランとして、Hybond-N⁺を用いた。キャピラリー・ブロッティングの際やその他の工程において、洗浄等のために、0.3Mクエン酸三ナトリウム-3M塩化ナトリウム溶液(pH 7.0)(20xSSC)を用いた。ブロッティング後には、0.4M水酸化ナトリウム水溶液を用い、トランスファー・メンブランをアルカリ固定した。プローブとしては、標識pAMY-Hygを用いた。ハイブリダイゼーションは、ブロッキング試薬を5%と塩化ナトリウムを0.5M含有するハイブリダイゼーション用緩衝液を用いて、42℃で行った。ハイブリダイゼーション後のプローブの洗浄には、尿素を6Mとドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を0.4%含有する0.5xSSCと、それらを含有しない2xSSCとを用いた。検出のために、

ルミノール酸化反応を用いて発光させ、それをオートラジオグラフィーにて検出した。

その結果、試験に供したすべての形質転換体のDNAについては、プローブとして用いられたpAMY-HygとハイブリダイズするDNA断片が検出されたのに対し、親株のDNAについては、そのようなDNA断片は検出されなかった。これは、形質転換体には、プラスミドpAMY-Hygに由来する遺伝子が導入されており、その結果として、形質転換体は、ハイグロマイシンB耐性の形質と高アミラーゼ活性を獲得したことを示すものである。

実施例5 形質転換体及び親株の培養上澄クロマト分画の分析

実施例4で得られたTF10株の培養上澄を、ミリポアフィルター（ミリポア社製、 $0.45\mu\text{m}$ ）で濾過した。その濾液 $500\mu\text{l}$ について、FPLC装置（フテルマシアバイオテック社製、カラム：RESOURCE Q）にて、クロマト分析〔緩衝液A：50mM Tris-HCl (pH 7.0)、緩衝液B：50mM Tris-HCl (pH 7.0)、1M NaCl〕を行った。

タカアミラーゼの溶出は、吸光度 (OD_{280}) でモニタリングすると共に、特定の画分についてアミラーゼ活性を測定することで確認した。その結果、NaCl濃度が0.2Mの画分に、タカアミラーゼが溶出していることが確認された（図2参照）。

一方、親株であるPF1022株の培養上澄も、同様に分析したが、タカアミラーゼの溶出は確認されなかった（図3参照）。

また、タカアミラーゼの標準品のクロマト分析結果と比較することにより、TF10株の培養上澄中の蛋白量を定量分析した。その結果、TF10株の培養上澄には、 5g/l （各画分の蛋白量の平均値）の濃度で、産生されたタカアミラーゼ酵素蛋白質が含有されていることが判明した。

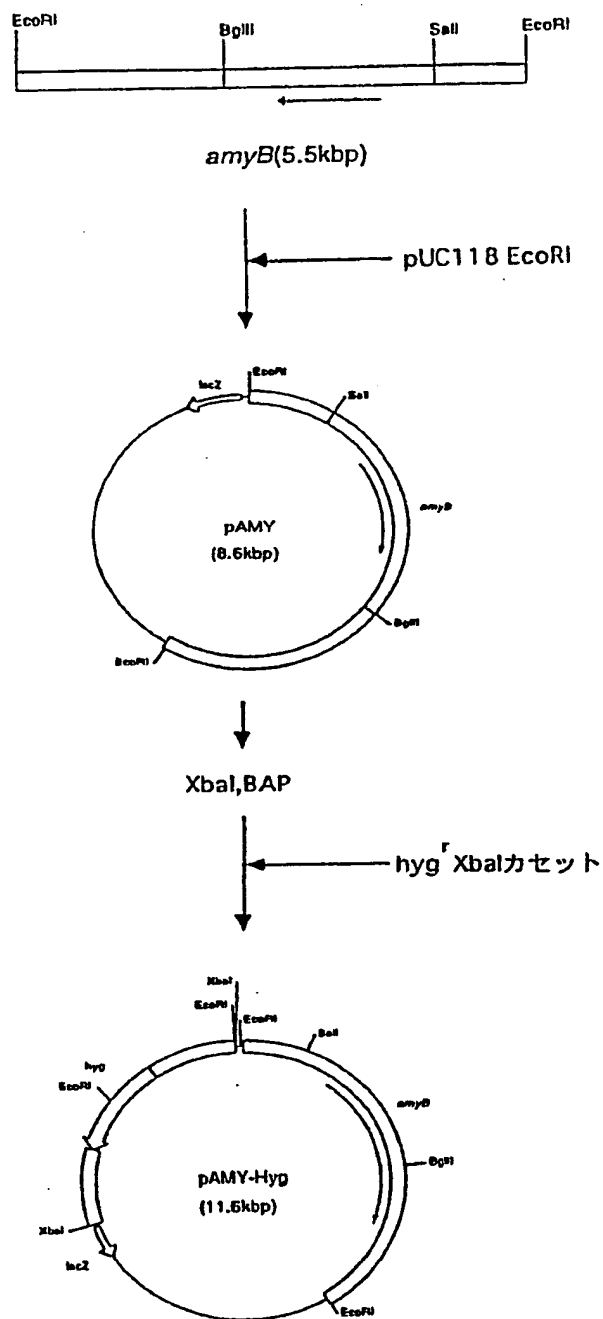
請求の範囲

1. PF1022物質を産生する宿主を、プロモーター、ターミネーター、マーカー遺伝子及び目的遺伝子から構成されたプラスミドを用いて形質転換してなる、PF1022物質を産生する形質転換体。
2. マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子又は栄養要求性遺伝子である、請求項1記載の形質転換体。
3. プロモーター及びターミネーターが、*Aspergillus nidulans*由来の菌が有するtrpC遺伝子のプロモーター及びターミネーターであり、マーカー遺伝子が、*Escherichia coli*由来の菌が有するハイグロマイシンB耐性遺伝子である、請求項1記載の形質転換体。
4. 目的遺伝子が、宿主が生合成する特定物質のその生合成に関与する物質をコードする遺伝子又は酵素をコードする遺伝子である、請求項1記載の形質転換体。
5. 宿主が、糸状菌綱に属する菌である、請求項1記載の形質転換体。
6. 糸状菌綱に属する菌が、無孢子不完全菌目に属する菌である、請求項5記載の形質転換体。
7. 無孢子不完全菌目に属する菌が、PF1022株である、請求項6記載の形質転換体。
8. 請求項1記載の形質転換体を培養する工程と、得られた培養物から生成物を取り出す工程からなる、PF1022物質の生産方法。
9. PF1022物質を産生する宿主を、プロモーター、ターミネーター、マーカー遺伝子及び、PF1022物質の生合成に関与する物質をコードする遺伝子及び／又は宿主の栄養利用に関連する物質をコードする遺伝子から構成されたプラスミドを用いて形質転換することからなる、PF1022物質産生菌のPF1022物質の生産性を向上させる方法。
10. 宿主の栄養利用に関連する物質が、酵素である、請求項9記載のPF1022物質産生菌のPF1022物質の生産性を向上させる方法。
11. 糸状菌綱孢子不完全菌目に属するPF1022株を、プロモーター、タ

ターミネーター、マーカー遺伝子及び目的遺伝子から構成されたプラスミドを用いて形質転換することからなる、形質転換方法。

図面

図 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01692

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N1/15, C12P17/18, C12N15/80, C12N15/67// (C12N1/15, C12R1:645), (C12P17/18, C12R1:645)
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N1/15, C12P17/18, C12N15/80, C12N15/67

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 3-35796, A (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), February 15, 1991 (15. 02. 91) & EP, 382173, A1 & US, 5116815, A	1 - 11
A	Gene, Vol. 57, (1987), Cullen D. et al.; "Transformation of Aspergillus nidulans with the hygromycin-resistance gene, hph"	1 - 11
A	JP, 2-268685, A (Jozo Shigen Kenkyusho K.K.), November 2, 1990 (02. 11. 90)	1 - 11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

September 13, 1996 (13. 09. 96)

Date of mailing of the international search report

September 24, 1996 (24. 09. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

図 2

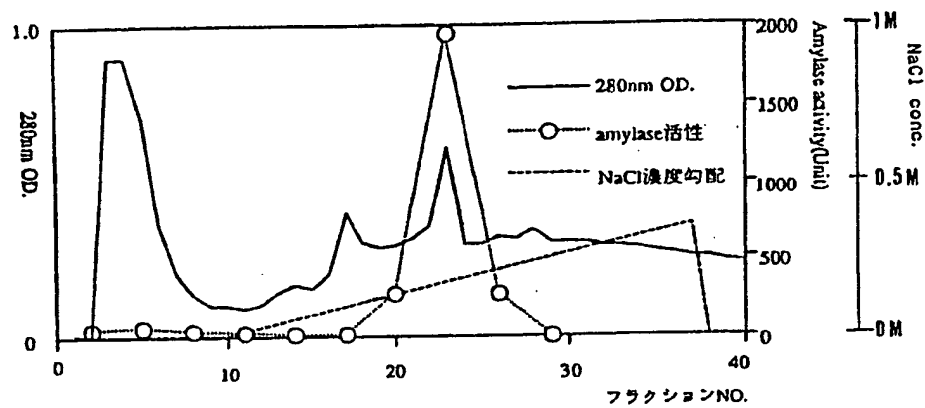
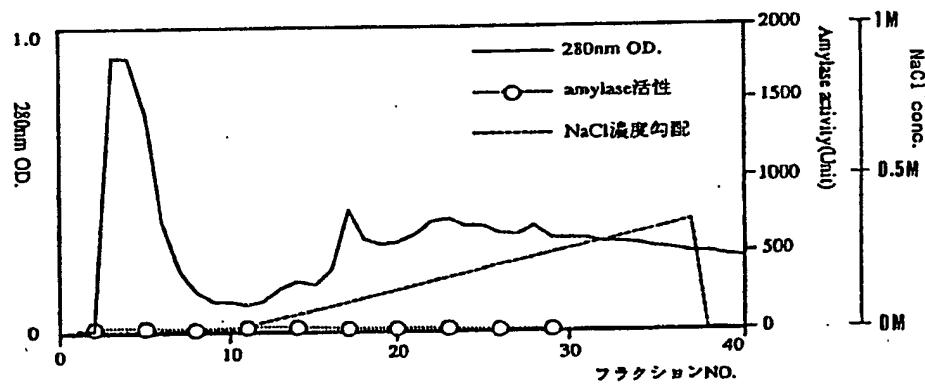


図 3



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N1/15, C12P17/18, C12N15/80, C12N15/67 // (C12N1/15, C12R1:645), (C12P17/18, C12R1:645)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N1/15, C12P17/18, C12N15/80, C12N15/67

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 3-35796, A (明治製菓株式会社) 15.2月. 1991 (15.02.91) & EP, 382173, A1 & US, 5116815, A	1-11
A	Gene, Vol. 57, (1987), Cullen D. et al.; 「Transformation of Aspergillus nidulans with the hygromycin-resistance gene, hph 」	1-11
A	JP, 2-268685, A (株式会社醸造資源研究所) 2.11月. 1990 (02.11.90)	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.09.96

国際調査報告の発送日

24.09.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齊藤 真由美

印

4B

9452

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)